

METHOD FOR CREATING PURE LINE GENUS EUSTOMA PLANT GENETICALLY BY USING HIGH DEGREE POLYPLOID POLLEN

Publication number: JP2000342093
Publication date: 2000-12-12
Inventor: MIYOSHI MASAHIRO; KATO NORIO
Applicant: JAPAN TOBACCO INC
Classification:
- **International:** **A01H1/00; A01H1/00; (IPC1-7): A01H1/00**
- **European:**
Application number: JP19990159139 19990607
Priority number(s): JP19990159139 19990607

Report a data error here

Abstract of JP2000342093

PROBLEM TO BE SOLVED: To create a pure line (homozygote) of genus Eustoma plant efficiently genetically by growing the ovule or seed contained in the ovary of a pistil of a genus Eustoma plant after the pistil is pollinated of a pollen obtained from a specific plant. **SOLUTION:** A pistil of a genus Eustoma plant is pollinated of a pollen obtained from a genus Eustoma high-degree polyploid plant, and subsequently the ovule or seed contained in the ovary of the pistil is grown. Further, a pistil of a genus Eustoma plant is pollinated of the pollen obtained from a genus Eustoma high-degree polyploid plant, subsequently the oval or seed contained in the ovary of the pistil is taken out and cultured on a culture medium. Thus, a pure line of genus Eustoma plant can be created genetically.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-342093

(P2000-342093A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl.⁷

A 0 1 H 1/00

識別記号

F I

A 0 1 H 1/00

データベース (参考)

Z 2 B 0 3 0

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平11-159139

(22) 出願日 平成11年 8 月 7 日 (1999. 8. 7)

(71) 出願人 000004589

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号

(72) 発明者 三好 正浩

栃木県小山市大字出井1900番地 日本たばこ産業株式会社植物開発研究所内

(72) 発明者 加藤 紀夫

栃木県小山市大字出井1900番地 日本たばこ産業株式会社植物開発研究所内

(74) 代理人 100091096

弁護士 平木 祐輔 (外 2 名)

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA01 CA07

CB02 CD03 CD07 CD09 CD14

CG01 HA01

(54) 【発明の名称】 高次倍量性花粉を利用した遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法

(57) 【要約】

【解決手段】 ユーストマ属植物の雌蕊に、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉を授粉した後、その雌蕊の子房に含まれる胚珠もしくは種子を生育させることを特徴とする遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法。

【効果】 F1品種の育成に有用な遺伝的に純系のユーストマ属植物を短期間で作製できる技術を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ユーストマ属植物の雌蕊に、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉を授粉した後、その雌蕊の子房に含まれる胚珠もしくは種子を生育させることを特徴とする遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法。

【請求項2】 ユーストマ属植物の雌蕊に、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉を授粉した後、その雌蕊の子房に含まれる胚珠もしくは種子を摘出し、これを培地で培養することを特徴とする遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝的に純系（同型接合体）のユーストマ属植物の作出方法に関する。遺伝的に純系のユーストマ属植物とは、半数体ユーストマ属植物を倍加した倍加半数体ユーストマ属植物のことであり、これは一代雑種（F1）品種の作出などに利用できる。

【0002】

【従来の技術】 昭和10年頃に日本へ導入されたトルコギキョウ（分類的には *Eustoma grandiflorum* (Ref.) Shinnery に属する）は、日本での育種が進展して、数多くの品種が育成されている。導入当初は生育や形質にばらつきがあったものの中から、優良な形質を有するものを選抜して、自殖を繰り返し、遺伝的に固定させて、品種としていた。ただしこの固定種では開花揃い、草姿、草勢などの均一性に欠ける面があった。そして近年になって、主に日本の種苗会社を中心として、この均一性を実現する為に、数多くのF1品種が育成されてきている。このF1品種を育成するためには、それぞれ遺伝的に固定されたばば純系（花粉親系統と種子親系統）を交配することが不可欠であり、よりよいF1品種を選抜するためには数多くの純系同士を交配させてやる必要がある。この純系を作出するためには、遺伝的に固定されていない植物体を5～8年にわたって自殖させてやる過程が必要となり、長い年限を要するのが現状である。その一方で、開発された品種の品種寿命は、消費流行の変化の加速化により、昔に比較して短くなってきている。よって従来の自殖による方法では、消費者の嗜好の変化に対応した品種を時期相応に作出することが困難になってきている。

【0003】 純系の植物体を短期間で作出する方法としては、蒴培養（Sudhir K. Sopory and Meenakshi Munshi, 1996, *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, 1, 145-176）、花粉培養（J. M. Dunwell, 1996, *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, 1, 205-216）、偽受精胚珠培養（Sara Sestili and Nadia Ficoe danti, 1996, *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, 1, 263-274）、未受精胚珠培養（E. R. Joachim Keller and Larissa Korzun, 1996, *In Vitro Haploid*

Production in Higher Plants, 1, 217-235) などの方法がある。蒴培養とは、蒴（雄しべ）の中の花粉を分裂させて植物体を再生させ、半数体の植物を得る技術である。蒴培養のうち、蒴から花粉を取り出して培養する場合を特に花粉培養という。また偽受精胚珠培養とは、偽受精を起こした胚珠から植物体を再生させ、半数体の植物を得る技術である。通常、花粉は雌しべ（柱頭）に受粉して、花粉管を伸ばし、花粉の中の精核が卵細胞と受精する。偽受精胚珠培養とは、放射線などで受精能力を失活させた花粉を交配させて、未受精卵の単為発生を促し（偽受精）、単為発生した偽受精卵を含む胚珠を培養して、植物体を再生させ、半数体の植物を得る手法である。未受精胚珠培養とは、上記偽受精胚珠培養における失活させた花粉を受精させることなく、未受精卵を含む胚珠を培養する方法である。一方、種間交雑による半数体の作出も知られている。種間交雑による半数体の成功例としては、オオムギ（*Hordeum vulgare*）におけるバルボサム法（K. J. Kesha and K. N. Kao, 1970, *Nature* 225, 874-878）や、タバコ（*Nicotiana tabacum*）への *N. africana* の花粉の授粉による半数体タバコの作出（Burk, L. G. et al, 1979, *Science* 206, 585）や、四倍性バレイショ（*Solanum tuberosum*）に二倍体野生種 *S. phureya* の花粉を授粉し、二倍性半数体のバレイショを得る事例（Hougas, R. W. et al, 1964, *Crop Science* 4, 593-595）が知られている。属間交雑による半数体作出例としては、コムギ（*Triticum aestivum*）にバルボサム（*H. bulbosum*）やトウモロコシ（*Zea mays*）を交雑して、コムギ半数体を得た報告（I. R. Barclay 1975, *Nature* 256, 410-411、牛山ら、1989, 育種学雑誌39, 別冊2, 146）や、オオムギにトウモロコシやイタリアンライグラスを交雑して、オオムギ半数体を作出した事例が知られている（Furusho et al., 1991, *Japan J. Breeding*, 41, 41-44）。

【0004】 上記した方法により再生した植物は、自然倍加が起こらない限り半数体である。そこで染色体数を倍加させる薬剤（コルヒチン、コルセミド、オリザリンなど）でカルスまたは植物体を処理し、染色体数を倍加させることにより（P. S. Rao and P. Suprasanna 1996, *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, 1, 317-339）、倍加半数体（純系の植物体）を得ることができる（ただし二倍性半数体であるバレイショは除く）。

【0005】 ユーストマ属の半数体作出に関する研究は先ず蒴培養で行われた（岡山農試、1991-1995）。この蒴培養によるユーストマ属半数体作出の報告例は1つだけあるが、幼苗段階で枯死している（岡山農試、1995）。そしてこの実験系による追試は成功していない。また同じグループが未受精胚珠及び偽受精胚珠を培養する方法も試みていたが、成功していない（岡山農試、1994-1995）。一方、種間交雑については、リンドウと

の風間交雑を利用したユーストマ属植物の半数体もしくは倍加半数体と推定される植物体の作出に関する報告がなされている(庄内日報98年8月18日付け)。なお、本願の出願時においてはまだ公知にはなっていないが、偽受精胚珠培養法については、本発明者により、放射線量及び培養条件を改良することにより半数体倍加系統を作出する系が確立されている(特願平10-177103号)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、遺伝的に純系のユーストマ属植物を短時間で作出する方法としては、偽受精胚珠培養と種間交雑を利用した方法が有効である。しかし、偽受精胚珠培養を行うには、放射線などによる花粉の不活化が必要であり、その際X線発生装置などの放射線源が必要となる。従って、これらの機械もしくは設備のない場合、偽受精胚珠培養を行うことが困難となりうる。また、上記のリンドウとの風間交雑を利用する方法は、倍加半数体の作出率があまり高くなく(一さや当たり40~50粒)、また、ユーストマ属植物とリンドウの開花時期を合わせる必要があるという欠点がある。本発明は、従来行われてきた遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法に関わる諸問題を解決することを目的としたものである。言い換えれば、短時間に純系の植物体を作成できる手段の提供を目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉をユーストマ属植物の雌蕊に授粉することにより、花粉を受けとったユーストマ属植物において単為発生が誘発されることを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、ユーストマ属植物の雌蕊に、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉を授粉した後、その雌蕊の子房に含まれる胚珠もしくは種子を生育させることを特徴とする遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法である。また、本発明は、ユーストマ属植物の雌蕊に、高次倍加ユーストマ属植物から得た花粉を授粉した後、その雌蕊の子房に含まれる胚珠もしくは種子を摘出し、これを培地で培養することを特徴とする遺伝的に純系のユーストマ属植物の作出方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明はユーストマ属植物の全てに適用できるが、特にトルコギキョウ(*Eustoma grandiflorum*)では良好な結果が得られる。本発明のユーストマ属植物は次のようにして作出することができる。まず、ユーストマ属植物の染色体を倍加させ、高次倍加ユーストマ属植物を作出する。染色体の倍加は、コルヒチン、コルセミド、オリザリンなどの通常の倍加処理時に用いられる試薬を含む溶液で処理することにより行うことができる。高次倍加ユーストマ属植物としては、4倍体植物が好ましいが、6

倍体植物、8倍体植物であってもよい。

【0009】次に、この高次倍加ユーストマ属植物から得られた花粉をユーストマ属植物の雌蕊に授粉する。授粉時期は、ユーストマ属植物の花芽が開花し、柱頭が開いて授粉可能となった時期であれば特に限定されない。また、単為発生を生じさせる方の植物が雄性不稔植物である場合を除き、開花前にその植物の葯を除去し、除雄しておくことが好ましい。さらに、除雄後は、意図しない交雑が起こるのを防止するため、蕾を袋で覆っておくことが好ましい。雄性不稔植物の場合は、除雄の必要はないが、袋がけは行うことが好ましい。授粉後、子房が十分に肥大するまで放置する。子房が十分に肥大化するまでの期間は、植物の種類や栽培環境により異なるが、通常授粉から3~4週間程度である。この肥大化した子房をそのまま放置して種子を採取し、それを生育させて植物体を作成することもできるが、エタノールなどで殺菌した後、無菌的に分解して胚珠を摘出し、これを所定の培地で培養することによっても植物体を作成することができる。摘出した胚珠は、胎座をつけたまま置床し、培養することも可能であるが、好ましくは、胚珠だけを置床する。ここで用いる培地の基本組成は特に限定されるものではなく、例えば、MS培地の無機塩及び有機物組成に蔗糖を加えたものを用いる。またコナツツミルクの添加が望ましい。培養開始から3~6週間程度で植物体が出現する。通常は、生育又は培養過程で自然倍加するので、特別な処理をすることなく、倍加半数体系統、即ち、遺伝的に純系の植物を得ることができるが、必要に応じて染色体を倍加させるための処理を行ってもよい。倍加処理は、コルヒチン、コルセミド、オリザリンなどの通常の倍加処理時に用いられる試薬を含む溶液を用いて行うことができる。また、予め半数体植物と倍加半数体植物とを識別し、半数体植物についてのみ倍加処理を行ってもよい。識別方法としては、染色体数の調査、孔辺細胞内の葉緑体数の計測、フローサイトメトリによる一細胞当たりのDNA含量の定量などの方法を用いることができる。

【0010】

【実施例】〔1〕花粉供与植物の作出及びその遺伝的性質の確認

(1) 除雄

ユーストマ属植物系統「P94IS3B」(一重性で、紫の花)をパイプハウスで栽培し、その蕾から開花前の葯をピンセットにより除去し、バラフィン紙製の袋で除雄した蕾を覆った。

(2) 授粉

除雄から2~7日後に、雌蕊が授粉可能となった状態の「P94IS3B」の花の袋を取り除き、ユーストマ属植物系統(品種名:ベアカリアピンク;八重性で、明ピンクの花)のF1品種。このF1品種は、一重性のユーストマ属植物固定系統と八重性のユーストマ属植物固定系統とを

交配させて育成させたものである)から採取した花粉を、「P94IS3B」の花の雌蕊の柱頭部に授粉した。その後再びパラフィン紙製の袋を「P94IS3B」の花に被せて他の花粉との意図しない交雑が起こるのを防止した。

【0011】(3) 採種

授粉から5～6週間後に「P94IS3B」の子房を採取し、定法に従い採種した。

(4) 花粉供与植物の遺伝的性質の確認

(3)で得た種子を定法に従い播種し、植物体を70個体栽培し開花させた。これらの植物体のうち、30個体が八重性、40個体が一重性を示し、その分離比はほぼ1:1であった($\chi^2=1.4286$ 5%水準で有意)。もし、「ベアクリアピンク」の有する八重性という形質が一重性という形質に対して優性であり、また、「P94IS3B」が一重性という形質をホモに持つものであると仮定すれば、八重性をヘテロに持つ「ベアクリアピンク」を「P94IS3B」に交配して得られる後代において、八重性と一重性の分離比は1:1となり、上記結果と一致する。従って、この仮定は正しく、ユーストマ属植物において「ベアクリアピンク」の持つ八重性という形質は遺伝的に優性であると推察される。

【0012】(2) 倍加ユーストマ属植物体の作出

(1) 倍加処理

「ベアクリアピンク」の種子を定法により播種した。播種から2～3週間後に子葉が展開したので、この幼植物体の茎頂部分裂組織を0.1%のコルヒチン水溶液で処理した。

(2) 倍加個体の選抜

処理した「ベアクリアピンク」を栽培し、孔辺細胞内の葉緑体数及び花粉粒の大きさを調べ、また、フローサイトメトリーにより一細胞当たりのDNA含量を定量した。この結果から染色体が倍加している個体を選抜した。この植物体を「倍加ベアクリアピンク」とした。

【0013】(3) 授粉及び胚珠培養

(1) 除雄

【1】と同様の方法で「P94IS3B」の除雄を行った。

(2) 授粉

【1】と同様の方法で「P94IS3B」の雌蕊に「倍加ベアクリアピンク」の花粉を授粉した。また、【1】と同様に授粉後の「P94IS3B」の花にパラフィン紙製の袋を被せた。

(3) 胚珠培養

授粉から2～4週間後に「P94IS3B」の子房を採取し、表面殺菌後、子房を解剖し胚珠を摘出し培地に置床した。培地には植物の組織培養で一般に利用されているMS培地を用いた。ただしショ糖を3%、ココナッツミルクを50ml/L、ゲランガムを0.6%添加し、pHは

5.8に調整した。

【0014】(4) 授粉及び採種

(1) 除雄

【1】と同様の方法で「P94IS3B」の除雄を行った。

(2) 交配

(2) 授粉

【1】と同様の方法で「P94IS3B」の雌蕊に「倍加ベアクリアピンク」の花粉を授粉した。また、【1】と同様に授粉後の「P94IS3B」の花にパラフィン紙製の袋を被せた。

(3) 採種

授粉から5～6週間後に「P94IS3B」の子房を採取し、定法に従い採種した。

【0015】(5) 授粉の結果得られた植物体の栽培試験及び倍数性の調査

(1) 植物体の出現

【3】で培養を開始した「P94IS3B」の胚珠から3～5週間で植物体が出現した。また【4】で採種した種子を定法通り播種すると、1～2週間で発芽した。

【0016】(2) 植物の開花検定

授粉の結果得られた植物体を栽培し開花させた。その結果、花粉として用いた「倍加ベアクリアピンク」の遺伝的関与の指標となりうる八重性を示した植物体は300個体中一つも見られなかった。また、それらすべての植物体が「P94IS3B」と同一の花色(紫)を示したわけではなく、花色が白であるものも8個体観察された。つまり、花色の形質は分離していた。これらの結果から、授粉の結果得られた植物体は「P94IS3B」の体細胞に由来するものではなく、P94IS3Bの卵細胞に由来するものと推察された。つまり、「倍加ベアクリアピンク」から得た花粉により「P94IS3B」において単為発生が誘発されたものと推察された。

【0017】(3) 倍数性の調査

得られた植物体から選んだ50個体の倍数性について、フローサイトメトリーによるDNA分析の結果、調査した個体は全て二倍性ユーストマ属植物であることが判明した。この結果から、単為発生により生じた「P94IS3B」の卵細胞に由来する半数体植物が培養の過程、又は種子の形成から生育の過程で自然倍加が起きたと推察された。

【0018】

【発明の効果】本発明は、効率的に遺伝的に純系(同型接合体)のユーストマ属植物を作出する方法を提供するものである。このような遺伝的に純系なユーストマ属植物を利用することにより、ユーストマ属植物のF1品種を効率的に短期間で育成することが可能になる。